

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

21.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 1 月 1 4 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 8 5 0 0 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 8 5 0 0 4]

出 願 人 浜松ホトニクス株式会社
Applicant(s):

REC'D 09 DEC 2004

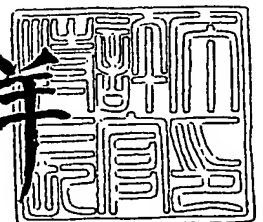
WIPO

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 2 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 2003-0749
【提出日】 平成15年11月14日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 21/01
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社
 内
 【氏名】 田口 武司
【発明者】
 【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町 1 1 2 6 番地の 1 浜松ホトニクス株式会社
 内
 【氏名】 平松 光夫
【特許出願人】
 【識別番号】 000236436
 【氏名又は名称】 浜松ホトニクス株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100088155
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 長谷川 芳樹
【選任した代理人】
 【識別番号】 100092657
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 寺崎 史朗
【選任した代理人】
 【識別番号】 100124291
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 石田 悟
【選任した代理人】
 【識別番号】 100110582
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 柴田 昌聰
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 014708
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

励起光を出力する励起光源と、
内部空間を有するピペットと、
内部空間を有するとともに先端に試料吸入口を有するチップと、
前記ピペットと前記チップとの間に装着可能であり、その装着時に前記ピペットおよび前記チップそれぞれの内部空間と連続する内部空間を有し、前記励起光源から出力された励起光を前記内部空間に導入するとともに該励起光を前記チップの試料吸入口に向けて照射する励起光導入手段を有するピペットアダプタと、
前記チップの試料吸入口に存在する試料に前記励起光が照射されることで該試料で発生する蛍光を検出する蛍光検出手段と、
を備えることを特徴とする蛍光測定装置。

【請求項 2】

前記励起光導入手段が、
外部から前記ピペットアダプタの内部空間に前記励起光を導入する励起光導入窓と、
前記励起光導入窓により前記内部空間へ導入された前記励起光を前記チップの試料吸入口に向けて反射させる反射鏡と、
を備えることを特徴とする請求項 1 記載の蛍光測定装置。

【請求項 3】

前記励起光導入手段が、外部から導波させた前記励起光を前記内部空間に設けられた一端から前記チップの試料吸入口に向けて出射する光ファイバを備える、ことを特徴とする請求項 1 記載の蛍光測定装置。

【請求項 4】

前記光ファイバの前記一端の近傍に設けられ前記励起光を集光する励起光集光手段を更に備えることを特徴とする請求項 3 記載の蛍光測定装置。

【請求項 5】

前記励起光導入手段が、外部から前記ピペットアダプタの内部空間に導入される前記励起光のうち所定波長帯域の成分のみを選択して前記チップの試料吸入口に向けて照射する、ことを特徴とする請求項 1 記載の蛍光測定装置。

【請求項 6】

前記蛍光検出手段が、前記試料から到達した光のうち蛍光を選択的に取り出す蛍光分離部と、この蛍光分離部により取り出された前記蛍光を検出する光検出器と、を有することを特徴とする請求項 1 記載の蛍光測定装置。

【請求項 7】

前記蛍光分離部が、前記励起光導入手段による励起光照射の光軸上であって前記試料の後方に設けられ蛍光を選択的に透過させる光フィルタを含み、
前記光検出器が、前記光フィルタを透過した蛍光を検出する、
ことを特徴とする請求項 6 記載の蛍光測定装置。

【請求項 8】

前記光軸上からの前記光フィルタの待避が可能である、ことを特徴とする請求項 7 記載の蛍光測定装置。

【請求項 9】

前記蛍光分離部が、前記励起光源と前記励起光導入手段との間に設けられ前記励起光を透過させるとともに前記蛍光を反射させるダイクロイックミラーを含み、
前記光検出器が、前記ダイクロイックミラーにより反射された蛍光を検出する、
ことを特徴とする請求項 6 記載の蛍光測定装置。

【請求項 10】

前記蛍光分離部が、前記励起光導入手段による励起光照射の光軸上とは異なる位置に設けられ蛍光を選択的に透過させる光フィルタを含み、
前記光検出器が、前記光フィルタを透過した蛍光を検出する、

ことを特徴とする請求項 6 記載の蛍光測定装置。

【請求項 1 1】

前記蛍光検出手段が、前記試料から到達した光をコリメートして前記光フィルタへ入射させるコリメート光学系を更に有する、ことを特徴とする請求項 7 または 1 0 に記載の蛍光測定装置。

【請求項 1 2】

前記ピペットアダプタに装着したときの前記チップの装着位置を規定する位置決め手段を更に備えることを特徴とする請求項 1 記載の蛍光測定装置。

【書類名】明細書

【発明の名称】蛍光測定装置

【技術分野】

【0001】

本発明は、励起光が照射された試料で発生する蛍光を検出する蛍光測定装置に関するものである。

【背景技術】

【0002】

医薬品工業、食品工業、化学工業及び農林水産業等の幅広い分野で、新薬の研究開発、酵素のスクリーニング、生理活性物質等の生体内微量機能物質の分析等を行うに際して、蛍光を測定することにより試料の分析が行われている。バイオ関連分野で重要な核酸や蛋白質等の生体試料を分析する場合には、測定対象である生体試料が微量しかなく、また、試料の定量も重要であることから、例えば、次に示すような方法により分析が行われる。

【0003】

すなわち、図9に示したようなピペット10及びチップ30が用いられて、ピペット10の先端に装着されたチップ30内に試料が計り取られ、この試料が特別な微量測定用セルに移し替えられる。そして、この試料が容れられたセルに対して側方から励起光が照射され、この試料から放出される蛍光のうちセルの側方（ただし、励起光照射方向とは異なる方向）に出た蛍光が光検出器により検出される。

【0004】

特許文献1に開示された方法では、試料が容れられたセルに対して上方から励起光が照射され、この試料から放出される蛍光のうちセルの上方に出た蛍光が光検出器により検出される。

【0005】

また、特許文献2に開示された方法では、試料が容れられたセルに対して上方から励起光が照射され、この試料から放出される蛍光のうちセルの下方に出た蛍光が光検出器により検出される。

【特許文献1】特開平5-38297号公報

【特許文献2】特開2002-71566号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上記のように試料をチップからセルに移し替えて蛍光測定を行う場合には、以下のような問題がある。すなわち、セルは、一般的に高価であり、使用後に洗浄・乾燥して再使用される。したがって、セルは、洗浄等の際に破損の可能性がある、取り扱いが容易でない。また、セルは、再使用されることからコンタミネーションの問題を有している一方で、十分に洗浄することが容易でない。

【0007】

また、試料は蛍光測定後に次の反応が行われることがあり、その場合には、蛍光測定のためにセルに容れられた試料は測定後に回収される必要がある。しかし、従来の蛍光測定技術では、試料の回収率が不十分であり、加えて、回収に伴う試料のコンタミネーションが発生するおそれがある。また、チップからセルへの試料の移し替えやセルの洗浄や乾燥等に時間を要する。

【0008】

さらに、セルに容れられる試料の量は一般に100 μ l（マイクロ・リットル）程度であり、試料が極微量しかない場合には、試料を希釈する必要がある場合がある。また、その貴重な試料をセルから完全に回収することは困難である。

【0009】

このように、セルに試料を移し替えて蛍光測定することは、様々な問題点を有している

。このセルを用いた場合の問題点を解消する蛍光測定技術として、セルに移し替えられること無くチップに試料が計り取られている状態で、このチップに対して側方から励起光を照射して、チップ内の試料から放出される蛍光のうちチップの側方（ただし、励起光照射方向とは異なる方向）に出た蛍光を光検出器により検出することも考えられる。

【0010】

この場合、チップに計り取られる試料は微量であり、また、一般にチップは安価であって1回限り使用されることから、セルを使用する場合のような問題点はない。しかし、チップの断面形状が円形であることから、チップによる励起光の散乱が大きく、それ故、蛍光測定には不適である。

【0011】

本発明は、上記問題点を解消する為になされたものであり、短時間で容易に微量の試料の蛍光を測定することができる蛍光測定装置を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明に係る蛍光測定装置は、(1) 励起光を出力する励起光源と、(2) 内部空間を有するピペットと、(3) 内部空間を有するとともに先端に試料吸入口を有するチップと、(4) ピペットとチップとの間に装着可能であり、その装着時にピペットおよびチップそれぞれの内部空間と連続する内部空間を有し、励起光源から出力された励起光を内部空間に導入するとともに該励起光をチップの試料吸入口に向けて照射する励起光導入手段を有するピペットアダプタと、(5) チップの試料吸入口に存在する試料に励起光が照射されることで該試料で発生する蛍光を検出する蛍光検出手段と、を備えることを特徴とする。

【0013】

この蛍光測定装置では、ピペットアダプタはピペットとチップとの間に装着されて用いられ、装着された状態では、ピペットアダプタ、ピペットおよびチップそれぞれの内部空間は連続している。チップの先端にある試料吸入口付近に試料が計り取られて、その状態で、これら相互に装着されたピペットアダプタ、ピペットおよびチップは所定位置に配置される。そして、励起光源から励起光が出力される。この出力された励起光は、励起光導入手段により、外部からピペットアダプタの内部空間に導入され、チップの試料吸入口に向けて照射されて、チップ内に容れられている試料に対して液面上方から照射される。この励起光照射により試料で発生する蛍光は蛍光検出手段により検出される。

【0014】

本発明に係る蛍光測定装置では、励起光導入手段は、外部からピペットアダプタの内部空間に励起光を導入する励起光導入窓と、励起光導入窓により内部空間へ導入された励起光をチップの試料吸入口に向けて反射させる反射鏡と、を備えるのが好適である。この場合には、励起光は、外部から励起光導入窓を介してピペットアダプタの内部空間に導入され、反射鏡により反射されてチップの試料吸入口に向けて照射される。

【0015】

本発明に係る蛍光測定装置では、励起光導入手段は、外部から導波させた励起光を内部空間に設けられた一端からチップの試料吸入口に向けて出射する光ファイバを備えるのが好適である。この場合には、励起光は、外部から光ファイバを導波して、ピペットアダプタの内部空間にある光ファイバの一端からチップの試料吸入口に向けて照射される。また、光ファイバの該一端の近傍に設けられ励起光を集光する励起光集光手段を更に備えるのが好適である。

【0016】

本発明に係る蛍光測定装置では、励起光導入手段は、外部からピペットアダプタの内部空間に導入される励起光のうち所定波長帯域の成分のみを選択してチップの試料吸入口に向けて照射するのが好適である。この場合には、蛍光測定にとって不要な波長成分が試料に照射されるのを低減することができ、チップ内の試料の温度が上昇するのを防止することができる。

【0017】

本発明に係る蛍光測定装置では、蛍光検出手段は、試料から到達した光のうち蛍光を選択的に取り出す蛍光分離部と、この蛍光分離部により取り出された蛍光を検出する光検出器と、を有するのが好適である。この場合には、励起光照射により試料で発生する蛍光は、蛍光分離部により選択的に取り出されて、光検出器により検出される。

【0018】

ここで、蛍光分離部は、励起光導入手段による励起光照射の光軸上であって試料の後方に設けられ蛍光を選択的に透過させる光フィルタを含み、光検出器が、光フィルタを透過した蛍光を検出するのが好適である。この場合には、光フィルタには、試料で発生した蛍光だけでなく、試料を透過した励起光も到達する。そのうち励起光は光フィルタにより遮断される一方、蛍光は光フィルタを透過して光検出器により検出される。また、光軸上からの光フィルタの待避が可能であれば、この蛍光測定装置は、試料の吸光度を測定する際にも用いられ得るので、等しい条件下における蛍光測定データおよび吸光度測定データを得ることができる。

【0019】

或いは、蛍光分離部は、励起光源と励起光導入手段との間に設けられ励起光を透過させるとともに蛍光を反射させるダイクロイックミラーを含み、光検出器が、ダイクロイックミラーにより反射された蛍光を検出するのも好適である。この場合には、試料で発生した蛍光のうち励起光照射方向とは逆の方向に進むものは、ダイクロイックミラーにより反射されて光検出器により検出される。なお、試料に照射された励起光の一部は試料により散乱されて、その散乱光の一部は蛍光とともにダイクロイックミラーに到達するが、このダイクロイックミラーは蛍光を選択的に反射させるので、散乱光は光検出器に入射しない。

【0020】

或いは、蛍光分離部は、励起光導入手段による励起光照射の光軸上とは異なる位置に設けられ蛍光を選択的に透過させる光フィルタを含み、光検出器が、光フィルタを透過した蛍光を検出するのも好適である。この場合には、試料で発生した蛍光のうち光フィルタに入射したものは、この光フィルタを透過して光検出器により検出される。なお、試料に照射された励起光の一部は試料により散乱されて、その散乱光の一部は、蛍光とともに光フィルタに入射するが、この光フィルタにより遮断される。

【0021】

蛍光分離部が上記の光フィルタを有する場合、蛍光検出手段は、試料から到達した光をコリメートして光フィルタへ入射させるコリメート光学系を更に有するのが好適である。この場合には、光フィルタへ光を垂直に入射させることができるので、光フィルタの実際の透過特性が設計どおりに得られて、蛍光は高い透過率で透過し得る一方で、励起光は高い遮断率で遮断され得る。

【0022】

本発明に係る蛍光測定装置は、ピペットアダプタに装着したときのチップの装着位置を規定する位置決め手段を更に備えるのが好適であり、この場合には、常に一定の状態でチップが装着されるため、チップの差込具合による蛍光測定位置の変動がなく、チップは蛍光測定装置の所定位置に再現性よく配置され得る。

【発明の効果】**【0023】**

本発明によれば、短時間で容易に微量の試料の蛍光を測定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】**【0024】**

以下、添付図面を参照して、本発明を実施するための最良の形態を詳細に説明する。なお、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。

【0025】

先ず、実施形態の蛍光測定装置において用いられる蛍光測定用ピペットおよびピペットアダプタについて説明する。図1は、蛍光測定用ピペット4の構成図である。同図には、蛍光測定用ピペット4の他にチップ30も示されている。また、図2は、ピペットアダプ

タ 20 の構成を示す断面図である。

【0026】

蛍光測定用ピペット 4 は、ピペット 10 およびピペットアダプタ 20 を備えて構成される。従来の構成を示した図 9 と比較すると、本実施形態では、ピペット 10 とチップ 30 との間にピペットアダプタ 20 が設けられる点で異なっている。ピペット 10 およびチップ 30 それぞれとしては、従来より市販され使用されているものが利用可能である。ピペット 10 とピペットアダプタ 20 とは、一体であってもよいし、互いに別体であって着脱自在でもよいが、一体のものとされていれば取り扱いが容易である。

【0027】

ピペットアダプタ 20 は、ピペット 10 の先端を挿入するピペット装着部 21 と、チップ 30 を装着するチップ装着部 22 とを有しており、ピペット 10 とチップ 30 との間に装着可能である。ピペットアダプタ 20 は、その装着時にピペット 10 およびチップ 30 それぞれの内部の空間と連続する内部空間 20A を有している。ピペットアダプタ 20 とピペット 10 との間の接合、および、ピペットアダプタ 20 とチップ 30 との間の接合は、チップ 30 内に試料を保持・静止させるために共に気密性が高いことが必要とされることから、ピペット装着部 21 およびチップ装着部 22 それぞれは、気密性に優れた材質である例えばゴム状物質や高分子でコーティングされていたり、また、特にピペット装着部 21 とピペット 10 との間においてゴム状物質からなる Oリング等の気密性保持部材を挟み込んでいたりしているのが好適である。

【0028】

また、ピペットアダプタ 20 は、外部から内部空間 20A に励起光を導入する励起光導入窓 23 と、その励起光導入窓 23 を透過して内部空間 20A へ導入された励起光をチップ装着部 22 の開口を経てチップ 30 の試料吸入口 31 に向けて反射させる反射鏡 24 とを備える。励起光導入窓 23 は、外部から内部空間 20A に導入する励起光のうち試料の蛍光測定に必要な所定波長帯域の成分のみを選択して透過するものであるのが好適である。同様に、反射鏡 24 も、内部空間 20A に導入された励起光のうち所定波長帯域の成分のみを選択して反射させるものであるのが好適である。或いは、内部空間 20A に導入された励起光のうち所定波長帯域の成分のみを選択して透過させるバンドパスフィルタをピペットアダプタ 20 の内部空間 20A に備えるのも好適である。

【0029】

次に、本発明に係る蛍光測定装置の第 1 実施形態について説明する。図 3 は、第 1 実施形態に係る蛍光測定装置 1 の構成図である。この図に示される蛍光測定装置 1 は、上述したピペット 10、ピペットアダプタ 20 およびチップ 30 に加えて、励起光源 41、レンズ 42、アパーチャ 43、レンズ 51、光フィルタ 52、光検出器 53 およびモータ 54 を備える。

【0030】

なお、光源 41 からアパーチャ 43 に到るまでの照射光学系と、レンズ 51 から光検出器 53 に到るまでの検出光学系とは、互いの相対的位置が固定されており、例えば、装置の筐体内に固定されて配置される。そして、これらに対して、チップ 30 が装着された蛍光測定用ピペット 4 は所定位置に着脱自在となっている。所定位置に蛍光測定用ピペット 4 を着脱自在に装着するには、固定スタンド筐体に対して磁石を用いて蛍光測定用ピペット 4 を固定したり、或いは、筐体に設けた孔に蛍光測定用ピペット 4 を挿嵌したりすることで、適切な光学的配置をとることができる。

【0031】

励起光源 41 は、チップ 30 の試料吸入口 31 から計り取られて保持される試料に照射すべき所定波長域の励起光を出力するものであり、例えば、紫外光を出力する重水素ランプが好適に用いられる。レンズ 42 は、励起光源 41 から出力された励起光をコリメートする。アパーチャ 43 は、レンズ 42 によりコリメートされた励起光の光束断面のうち一部を通過させて、その通過させた励起光をピペットアダプタ 20 の励起光導入窓 23 へ入射させる。なお、励起光源 41 とピペットアダプタ 20 との間の励起光光路上にシャッタ

を設けるのも好適であり、この場合には、試料への励起光の照射時間を規定し、試料に励起光が長時間照射されることに因る試料温度の上昇を防止することができる。

【0032】

レンズ51、光フィルタ52および光検出器53は、反射鏡24から試料への励起光照射の光軸上であって、試料の後方（試料を挟んで反射鏡24の反対側）に設けられている。レンズ51は、チップ30の試料吸入口31に保持される試料から下方に出て到達した光をコリメートして、そのコリメートした光を光フィルタ52へ入射させる。レンズ51のコリメート作用を考慮すると、蛍光を発する試料が点光源であるとみなし得る程度に、チップ30の試料吸入口31に保持される試料の寸法が小さいことが望ましく、そのような試料寸法とすることができる試料吸入口31の形状とすることが望ましい。光フィルタ52は、レンズ51によりコリメートされた光を入力して、この入力した光のうち蛍光を透過させる一方で励起光を遮断することで、蛍光を選択的に取り出す。光検出器53は、光フィルタ52を透過して到達した蛍光を受光し、この蛍光の強度に応じた値の電流信号を出力するものであり、例えば、光電子増倍管やフォトダイオード等が好適に用いられる。

【0033】

モータ54は、光フィルタ52が取り付けられた円板55を回転させるものである。この円板55には、光フィルタ52として透過波長域が異なる複数のものが設けられていてもよいし、光を遮断する遮蔽部が設けられていてもよいし、また、そのまま光を通過させる開口部が設けられていてもよい。モータ54が円板55の回転方位を適切に設定することにより、試料で発生する蛍光の波長に合わせて適切な透過波長域を有する光フィルタ52が選択され、或いは、光検出器53への光の入射を遮断する遮蔽部が選択され、或いは、試料から到達した光をそのまま光検出器53へ入射させる開口部が選択される。このように、光軸上から光フィルタ52が待避して、光軸上に開口部が位置する場合には、この蛍光測定装置1は吸光度測定にも用いられ得るので、等しい条件下における蛍光測定データおよび吸光度測定データを得ることができる。

【0034】

次に、第1実施形態に係る蛍光測定装置1の動作について説明する。初めに、蛍光測定用ピペット4にチップ30が装着され、試料容器からチップ30内に試料が計り取られて収容される。この試料としては、特に限定されるものではなく、溶液状、半固体状又は固体状であってもよく、適当な溶媒を用いて蛍光測定を行い得る濃度とされたものであればよい。より具体的には、生体試料としての尿サンプル、血液サンプル、体液サンプル若しくは生体組織、核酸、蛋白質若しくは塩基等の蛍光性物質や蛍光標識化物質等が挙げられ、生体試料以外の試料としては、河川水、湖沼水、海水、水道水、雨水、焼却灰、廃棄物若しくは環境中の動植物サンプル等の環境試料、一般に使用される金属、セラミック、プラスチック、それらの抽出液若しくは溶解液、ガス若しくはそれらの吸収物等、又は、合成された物質等の分析サンプルの蛍光性物質や蛍光標識化物質が挙げられる。そして、蛍光測定用の試料としては、これら溶質として、適当な溶媒に溶解又は分散させたものを用いることができる。

【0035】

次いで、この状態を維持したまま、蛍光測定用ピペット4は蛍光測定装置1の所定位置に配置される。図3には、この装着時の光学系が示されている。そして、光源41から励起光が出力される。励起光源41から出力された励起光は、レンズ42によりコリメートされ、アパーチャ43を通過し、ピペットアダプタ20の励起光導入窓23に入射する。その励起光は、励起光導入窓23を透過して、ピペットアダプタ20の内部空間20Aに導入され、反射鏡24により反射される。反射された励起光は、チップ30内に収容されている試料に対して液面上方から照射される。

【0036】

この励起光照射に因り試料で蛍光が発生する。この蛍光は、全ての方向に放射され、その一部がチップ30の試料吸入口31から外部へ出力される。その蛍光のうち下方に放射

されてレンズ51に入力したものは、レンズ51によりコリメートされて、光フィルタ52に垂直入射し、この光フィルタ52を透過して、光検出器53により受光される。そして、この受光された蛍光の強度に応じた値の電流信号が光検出器53から出力され、この電流信号が電圧信号に変換され、この電圧信号が例えばコンピュータ（不図示）に入力されて解析される。なお、試料に照射された励起光の一部は、試料を透過して、入射方向と同一の方向に出射されるが、光フィルタ52により遮断される。したがって、光検出器53へ入射する励起光の光量は極僅かである。

【0037】

このようにして蛍光測定が終了すると、蛍光測定の為に蛍光測定用ピペット4に装着されたチップ30に容れられた試料は、目的の反応容器に移される。したがって、試料を回収するステップを省くことができ、回収に伴う試料のコンタミネーションの発生が回避され、また、高価な蛍光測定用のセルが不要であって、微量試料の蛍光測定が迅速に行われる。また、従来の市販のチップ30を用いることができるので安価であり、使用後のチップ30を廃棄することもできる。さらに、断面形状が円形であるチップ30の側方から励起光を照射するのではなく、試料の液面の上方から励起光を照射するので、チップ30による励起光の散乱が小さい。このように、本実施形態に係る蛍光測定装置1を用いることにより、短時間で容易に微量の試料の蛍光を測定することができる。

【0038】

次に、本発明に係る蛍光測定装置の第2実施形態について説明する。図4は、第2実施形態に係る蛍光測定装置2の構成図である。この図に示される蛍光測定装置2は、上述したピペット10、ピペットアダプタ20およびチップ30に加えて、励起光源41、レンズ42、アパーチャ43、ダイクロイックミラー44および光検出器53を備える。

【0039】

前の図3に示された蛍光測定装置1と比較すると、この図4に示される蛍光測定装置2は、レンズ51、光フィルタ52およびモータ54を備えていない点、ダイクロイックミラー44を備えている点、ならびに、光検出器53が設けられている位置の点、で相違する。ダイクロイックミラー44は、アパーチャ43とピペットアダプタ20の励起光導入窓23との間の励起光の光路上に斜めに設けられ、励起光を透過させるとともに、蛍光を反射させる。光検出器53は、ダイクロイックミラー44により反射された蛍光を検出する。

【0040】

次に、第2実施形態に係る蛍光測定装置2の動作について説明する。初めに、蛍光測定用ピペット4にチップ30が装着され、試料容器からチップ30内に試料が計り取られて収容される。次いで、この状態を維持したまま、蛍光測定用ピペット4は蛍光測定装置2の所定位置に配置される。図4には、この装着時の光学系が示されている。そして、光源41から励起光が出力される。励起光源41から出力された励起光は、レンズ42によりコリメートされ、アパーチャ43を通過し、ダイクロイックミラー44を透過し、ピペットアダプタ20の励起光導入窓23に入射する。その励起光は、励起光導入窓23を透過して、ピペットアダプタ20の内部空間20Aに導入され、反射鏡24により反射される。反射された励起光は、チップ30内に収容されている試料に対して液面上方から照射される。

【0041】

この励起光照射に因り試料で発生する蛍光は、全ての方向に放射される、その蛍光のうち上方（励起光照射方向と逆の方向）に放射されたものは、反射鏡24により反射され、励起光導入窓23を透過し、ダイクロイックミラー44により反射されて、光検出器53により受光される。そして、この受光された蛍光の強度に応じた値の電流信号が光検出器53から出力され、この電流信号が電圧信号に変換され、この電圧信号が例えばコンピュータ（不図示）に入力されて解析される。なお、試料に照射された励起光の一部は試料により散乱されて、その散乱光の一部は、蛍光とともにダイクロイックミラー44に入射するが、このダイクロイックミラー44を透過する。したがって、光検出器53へ入射する

励起光の光量は極僅かである。

【0042】

本実施形態に係る蛍光測定装置 2 も、上述した第 1 実施形態に係る蛍光測定装置 1 と同様の効果を奏することができる。加えて、本実施形態に係る蛍光測定装置 2 では、光検出器 53 が受光する励起光およびその散乱光の光量が第 1 実施形態と比較すると極めて少ない点が優れている。

【0043】

次に、本発明に係る蛍光測定装置の第 3 実施形態について説明する。図 5 は、第 3 実施形態に係る蛍光測定装置 3 の構成図である。この図に示される蛍光測定装置 3 は、上述したピペット 10、ピペットアダプタ 20 およびチップ 30 に加えて、励起光源 41、レンズ 42、アパーチャ 43、レンズ 51、光フィルタ 52、光検出器 53 およびモータ 54 を備える。

【0044】

前の図 3 に示された蛍光測定装置 1 と比較すると、この図 5 に示される蛍光測定装置 3 は、レンズ 51、光フィルタ 52、光検出器 53 およびモータ 54 が設けられている位置の点で相違する。本実施形態では、レンズ 51、光フィルタ 52 および光検出器 53 は、反射鏡 24 から試料への励起光照射の光軸上とは異なる位置に設けられている。好適には、レンズ 51 から光検出器 53 に到るまでの検出光学系の光軸は、反射鏡 24 から試料への励起光照射の光軸に対して直交している。

【0045】

レンズ 51 は、チップ 30 の試料吸入口 31 に保持される試料から側方に出て到達した光をコリメートして、そのコリメートした光を光フィルタ 52 へ入射させる。光フィルタ 52 は、レンズ 51 によりコリメートされた光を入力して、この入力した光のうち蛍光を透過させる一方で励起光を遮断することで、蛍光を選択的に取り出す。光検出器 53 は、光フィルタ 52 を透過して到達した蛍光を受光し、この蛍光の強度に応じた値の電流信号を出力する。

【0046】

なお、本実施形態では、チップ 30 の試料吸入口 31 に保持される試料は励起光照射方向に長いのが好ましく、そのような試料寸法とすることができる試料吸入口 31 の形状とすることが望ましい。このようにすることにより、励起光が試料中を通過する距離が長くなって、試料における励起光吸収効率が高まり、蛍光の放出量を多くすることができる。このとき、蛍光を発する試料は、点光源ではなく、励起光照射方向に長い光源とみなし得る。したがって、レンズ 51 はシリンドリカルレンズであるのが好ましい。また、光検出器 53 の有効な受光面も励起光照射方向に長いのが好ましい。また、本実施形態では、試料で発生した蛍光はチップ 30 を透過して光検出器 53 により検出されるので、チップ 30 は蛍光波長において透過率が高いのが好ましい。

【0047】

さらに、チップ 30 内に試料が計り取られて収容されている状態でチップ 30 は蛍光測定装置 3 の所定位置に再現性よく配置される必要がある。特に本実施形態では、蛍光を検出するための検出光学系がチップ 30 の側方にあるので、蛍光測定装置 3 における蛍光測定用ピペット 4 の配置は高精度になされることが重要である。そのためには、前述したような蛍光測定用ピペット 4 の蛍光測定装置 3 に対する固定に加え、チップ 30 の差込具合による蛍光測定位置の変動がないように、チップ 30 が蛍光測定用ピペット 4 のピペットアダプタ 20 に常に一定の位置で装着される必要がある。

【0048】

そこで、ピペットアダプタ 20 に装着したときのチップ 30 の装着位置を規定する位置決め手段を更に備えるのが好適である。例えば、図 6 (a) または (b) に示されるように、チップ 30 の上端側に設けた段差であるストッパ 61 とチップ装着部 22 の先端とが当接することにより、或いは、ピペットアダプタ 20 の途中に設けた段差であるストッパ 61 とチップ 30 の上端とが当接することにより、チップ 30 がピペットアダプタ 20 に

対して常に一定の位置で装着される。

【0049】

次に、第3実施形態に係る蛍光測定装置3の動作について説明する。初めに、蛍光測定用ピペット4にチップ30が装着され、試料容器からチップ30内に試料が計り取られて収容される。次いで、この状態を維持したまま、蛍光測定用ピペット4は蛍光測定装置3の所定位置に配置される。図5には、この装着時の光学系が示されている。そして、光源41から励起光が出力される。励起光源41から出力された励起光は、レンズ42によりコリメートされ、アパーチャ43を通過し、ピペットアダプタ20の励起光導入窓23に入射する。その励起光は、励起光導入窓23を透過して、ピペットアダプタ20の内部空間20Aに導入され、反射鏡24により反射される。反射された励起光は、チップ30内に収容されている試料に対して液面上方から照射される。

【0050】

この励起光照射に因り試料で発生する蛍光は、全ての方向に放射される。その蛍光のうち側方に放射されてレンズ51に入力したものは、レンズ51によりコリメートされて、光フィルタ52に垂直入射し、この光フィルタ52を透過して、光検出器53により受光される。そして、この受光された蛍光の強度に応じた値の電流信号が光検出器53から出力され、この電流信号が電圧信号に変換され、この電圧信号が例えばコンピュータ（不図示）に入力されて解析される。なお、試料に照射された励起光の一部は試料により散乱されて、その散乱光の一部は、蛍光とともに光フィルタ52に入射するが、この光フィルタ52により遮断される。したがって、光検出器53へ入射する励起光の光量は極僅かである。

【0051】

本実施形態に係る蛍光測定装置3も、上述した第1実施形態に係る蛍光測定装置1と同様の効果を奏することができる。加えて、本実施形態に係る蛍光測定装置3では、光検出器53が受光する励起光の光量が極めて少なく、その一方で、光検出器53が受光する蛍光の光量が多いので、蛍光検出のS/N比が優れる。また、この蛍光測定装置3では、吸光度測定用の光学系（光フィルタ、光検出器）をチップ30の下方に設けておけば、蛍光測定および吸光度測定を同時に行うことができる。

【0052】

次に、実施形態の蛍光測定装置において用いられるピペットアダプタの変形例について説明する。図7は、変形例のピペットアダプタ120の構成を示す断面図である。このピペットアダプタ120は、ピペット10の先端を挿入するピペット装着部121と、チップ30を装着するチップ装着部122とを有しており、ピペット10とチップ30との間に装着可能である。ピペットアダプタ120は、その装着時にピペット10およびチップ30それぞれの内部の空間と連続する内部空間120Aを有している。ピペットアダプタ120とピペット10との間の接合、および、ピペットアダプタ120とチップ30との間の接合は、チップ30内に試料を保持・静止させるために共に気密性が高いことが必要とされることから、ピペット装着部121およびチップ装着部122それぞれは、気密性に優れた材質である例えばゴム状物質や高分子でコーティングされていたり、また、特にピペット装着部121とピペット10の間においてゴム状物質からなるOリング等の気密性保持部材を挟み込んでいたりするのが好適である。

【0053】

また、ピペットアダプタ120は、光ファイバ123およびレンズ124を備える。光ファイバ123は、外部から導波させた励起光を内部空間120Aに設けられた一端から出力する。レンズ123は、光ファイバ123の該一端から出力された励起光を平行光とし、その励起光をチップ装着部122の開口を経てチップ30の試料吸入口31に向けて照射する。内部空間120Aに導入された励起光のうち所定波長帯域の成分のみを選択して透過させるバンドパスフィルタをピペットアダプタ120の内部空間120Aに備えるのも好適である。また、光ファイバ123として先端が球状レンズまたはセルフオクレンズとなっているものを用いるのも好適であり、この場合にはレンズ124は不要である。

【0054】

このピペットアダプタ120は、上述した蛍光測定装置1～3それぞれにおいてピペットアダプタ20に替えて用いられる。このようなピペットアダプタ120を用いる場合には、光源40から出力された励起光は、光ファイバ123の外部の一端から入力され、光ファイバ123を導波し、光ファイバ123の内部空間120A内の一端から出射される。その出射された励起光は、既に述べたのと同様にしてチップ30内の試料に照射される。

【0055】

本発明は、上記実施形態に限定されるものではなく、種々の変形が可能である。例えば、第1及び第3実施形態それぞれの装置は、試料から発生する化学発光の定量等にも適用が可能である。また、各実施形態の装置を組み合わせ、例えば、第1実施形態の装置で試料からの前方散乱光を検出し、第3実施形態の装置で試料からの側方散乱光を検出して、これらの結果を解析することにより試料の特性の分析が可能である。

【実施例】

【0056】

上述した第3実施形態に係る蛍光測定装置3を用いた蛍光測定の実施例について説明する。試料容量は20 μ lであり、試料濃度を4段階に変えて、それら各濃度の試料について蛍光測定装置3を用いて蛍光を5回測定した。蛍光測定の1回毎に、蛍光測定用ピペット4を蛍光測定装置3に装着して測定し、測定終了後に蛍光測定用ピペット4を蛍光測定装置3から取り外した。

【0057】

図8は、蛍光測定結果を示すグラフである。この図の横軸は試料濃度を示し、縦軸は蛍光強度を示す。このグラフから判るように、この実施例における試料の濃度範囲では、測定により得られた蛍光強度は、試料濃度に対して略線形関係にあり、しかも、再現性がよいものであった。

【産業上の利用可能性】

【0058】

微量な物質の蛍光を測定する場合、従来ではマイクロセルと呼ばれる蛍光測定用の高価なセルが必要であったが、本発明では特別なセルが不要になる。したがって、本発明では、セルへの試料の移動、セルの洗浄、乾燥等、時間のかかる一切の作業をなくすることができる。

【0059】

また、これまで最少量でも100 μ l程度の容量が必要であったため、試料を希釈せざるを得ず、或いは、試料自体を大量に必要としたが、本発明の装置により、数 μ l～数十 μ lと極微量の試料容積で蛍光測定が可能となるため、希釈の必要がなくなるばかりでなく、測定に必要な試料の量を激減でき、しかも、次の作業でそのまま測定した試料を利用することができ、試料のムダが完全になくなる。

【0060】

さらに、数 μ l～数十 μ lと極微量で蛍光物質が含まれているかどうかの判定を迅速かつ簡便にできるため、バイオ試料の電気泳動やHPLCによる分離作業の前に予め蛍光物質が間違いなく含まれているかどうかを予備的に確認することができ、また、バイオ試料の分離後、どの分画に目的とする蛍光（標識）物質が含まれているかを容易に知ることができ、作業の高効率化に役立つ。

【0061】

また、特に多検体の蛍光測定には、本発明の装置は有効であり、例えば酵素反応の最適化条件の検討、酵素反応の経時的モニタリング、酵素阻害剤のスクリーニング等に用いることができる。

【0062】

さらに、吸光度と蛍光とを測定できるため、例えば、核酸あるいはタンパク質の吸光度

と蛍光標識色素の蛍光とを同時に測定できるので、ある分画に蛍光標識化された核酸あるいはタンパク質が含まれているかどうかの確認ができる。

【0063】

本発明においては、バイオ分野の研究者が最もなじみ深いピペットを用いて、ごく通常の方法で、極微量の液滴を空气中に非常に容易に保持できる。

【0064】

試料に対してチップの側方からの励起では、チップ自体によって大きな散乱が起こってしまい、また、試料の下方からの励起では、チップ先端近傍での散乱を伴ってしまう。これに対して、本発明では、試料に対して液面上方から励起光を入射するため、チップ自体による励起光の散乱を最小化できる。

【0065】

液滴をガラス基板上に滴下し、例えば光ファイバを用いて励起光を滴下した試料に照射して、蛍光を検出する方法が考えられるが、バイオ分野では、コンタミネーションの問題があるので、ピペットから滴下した試料を再び回収して、次の実験には使われない。また、この回収も完全には行えない。これに対して、本発明の蛍光測定装置は、簡便に、迅速に、しかも何らコンタミネーションを起こさず、無駄なく蛍光測定ができる。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】 蛍光測定用ピペット4の構成図である。

【図2】 ピペットアダプタ20の構成を示す断面図である。

【図3】 第1実施形態に係る蛍光測定装置1の構成図である。

【図4】 第2実施形態に係る蛍光測定装置2の構成図である。

【図5】 第3実施形態に係る蛍光測定装置3の構成図である。

【図6】 ピペット30の位置決め方法を説明する図である。

【図7】 変形例のピペットアダプタ120の構成を示す断面図である。

【図8】 蛍光測定結果を示すグラフである。

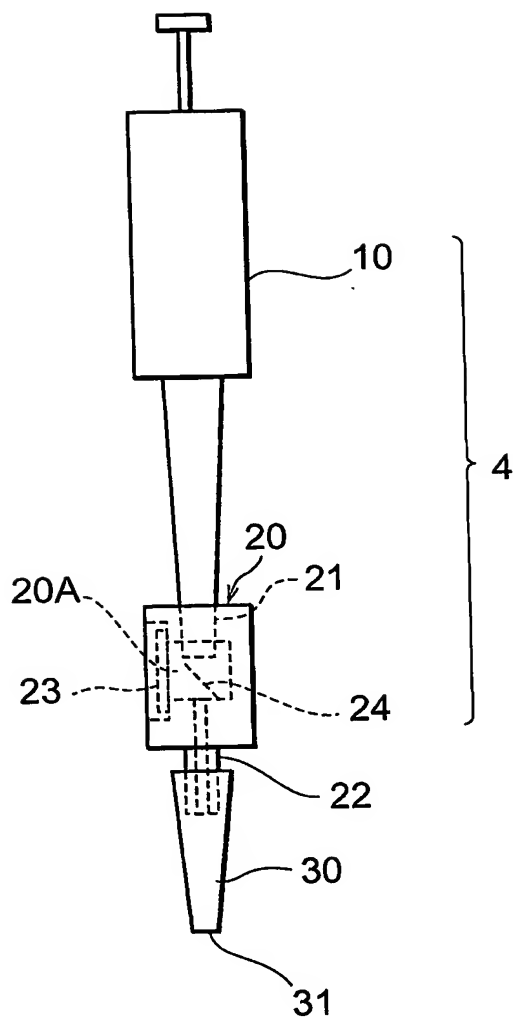
【図9】 ピペット10およびチップ30の従来の構成を示す図である。

【符号の説明】

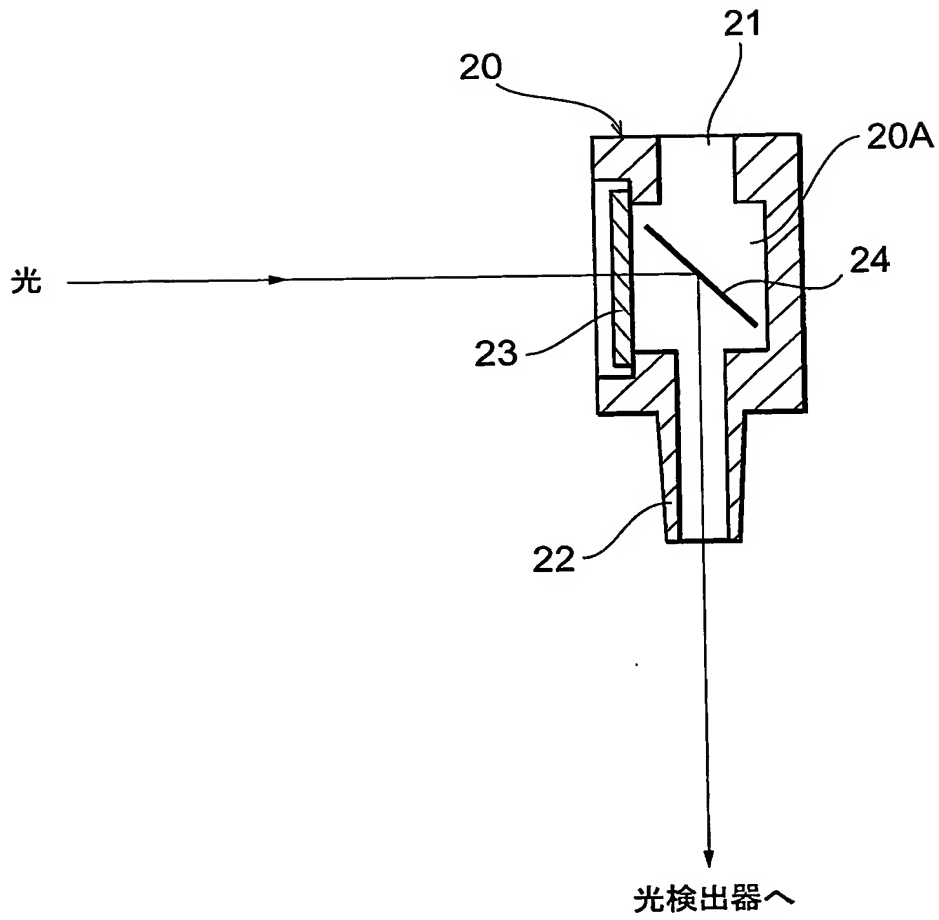
【0067】

1～3…蛍光測定装置、4…蛍光測定用ピペット、10…ピペット、20…ピペットアダプタ、21…ピペット装着部、22…チップ装着部、23…励起光導入窓、24…反射鏡、25…光ファイバ、26…レンズ、30…チップ、31…試料吸入口、41…励起光源、42…レンズ、43…アパーチャ、44…ダイクロイックミラー、51…レンズ、52…光フィルタ、53…光検出器、54…モータ、61…ストッパ、120…ピペットアダプタ、121…ピペット接合部、122…チップ接合部、123…光ファイバ、124…レンズ。

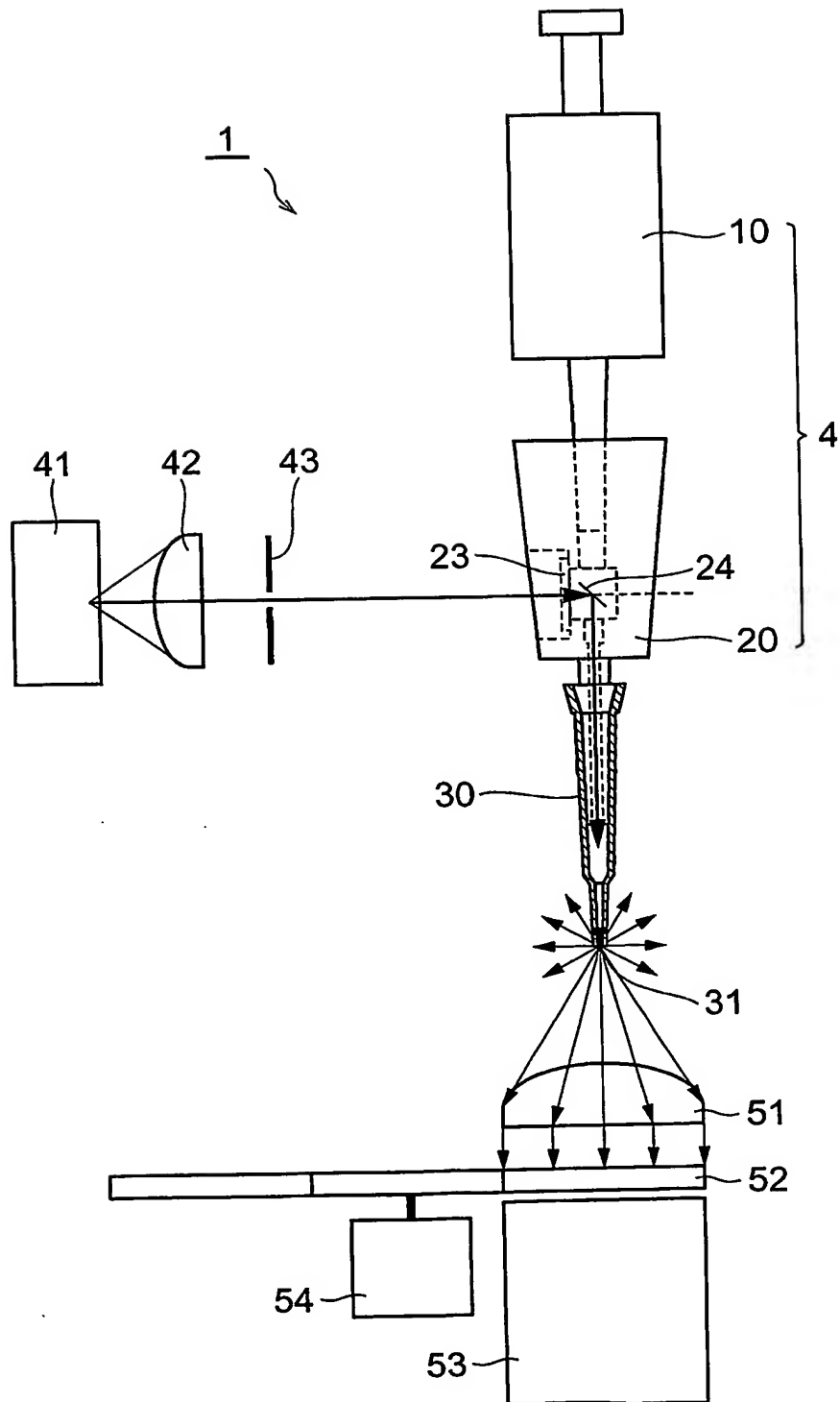
【書類名】 図面
【図 1】



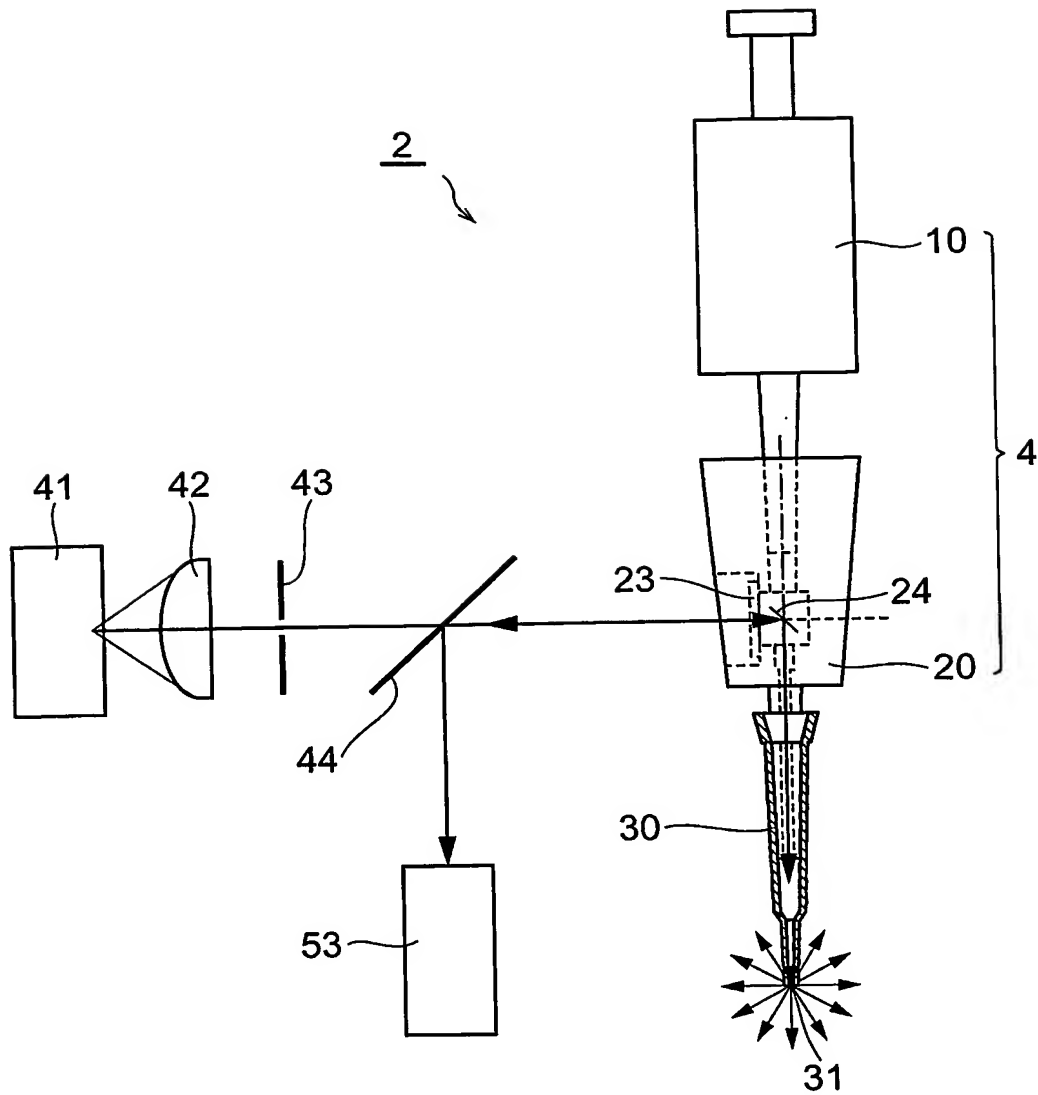
【図 2】



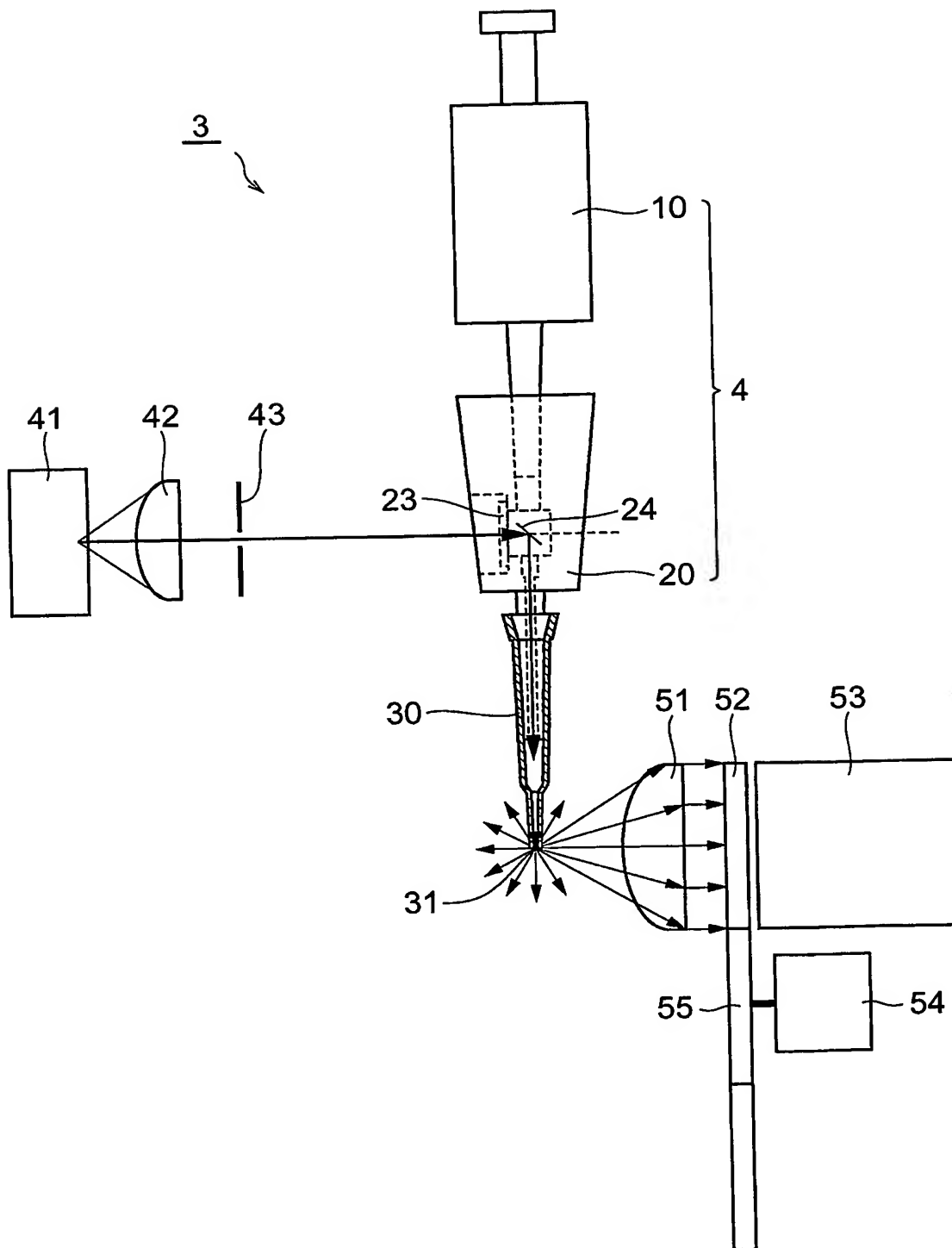
【図 3】



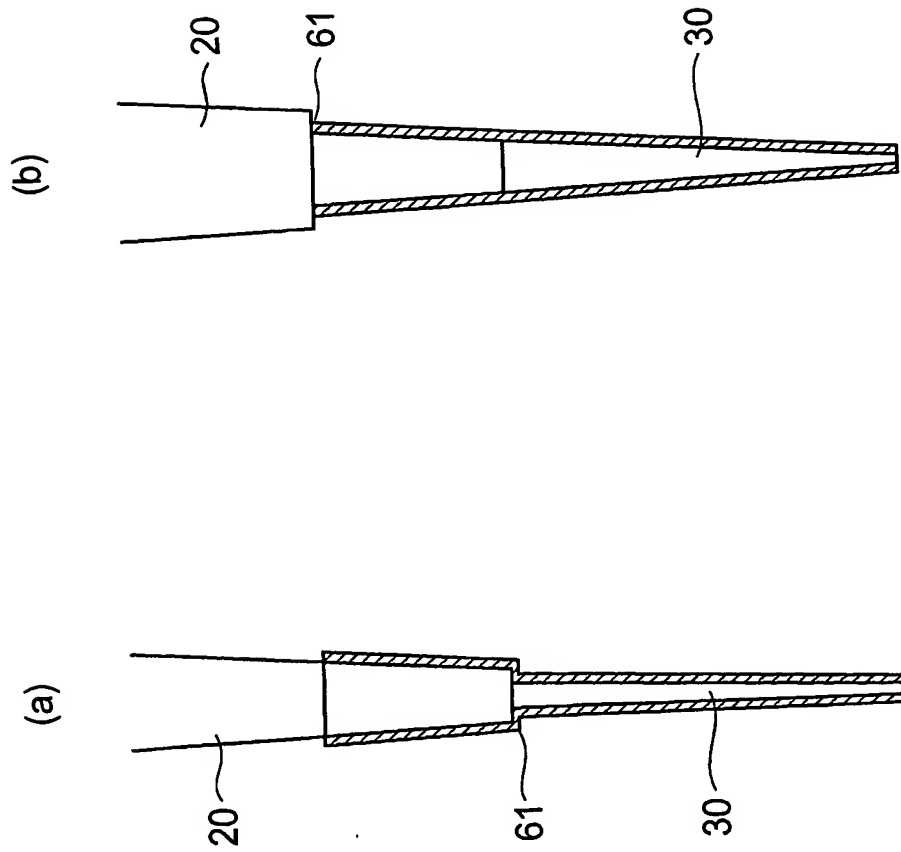
【図 4】



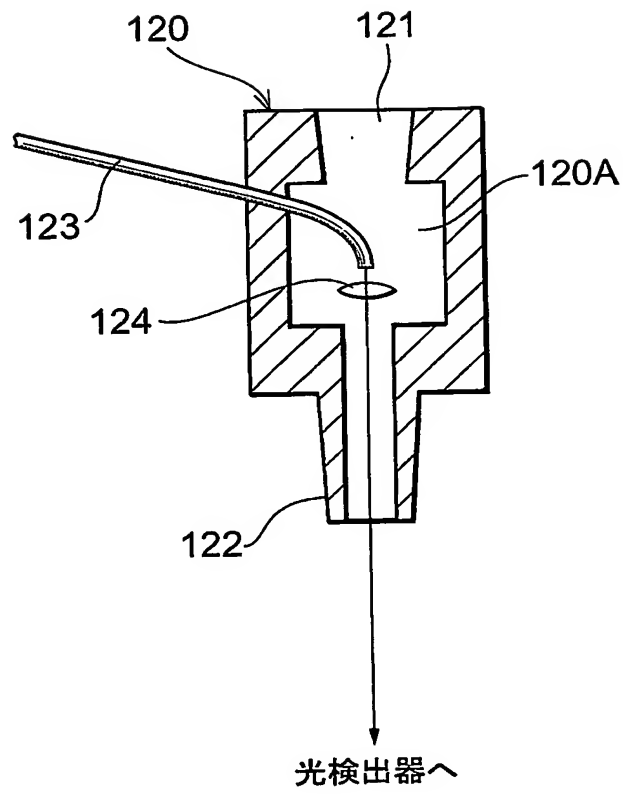
【図 5】



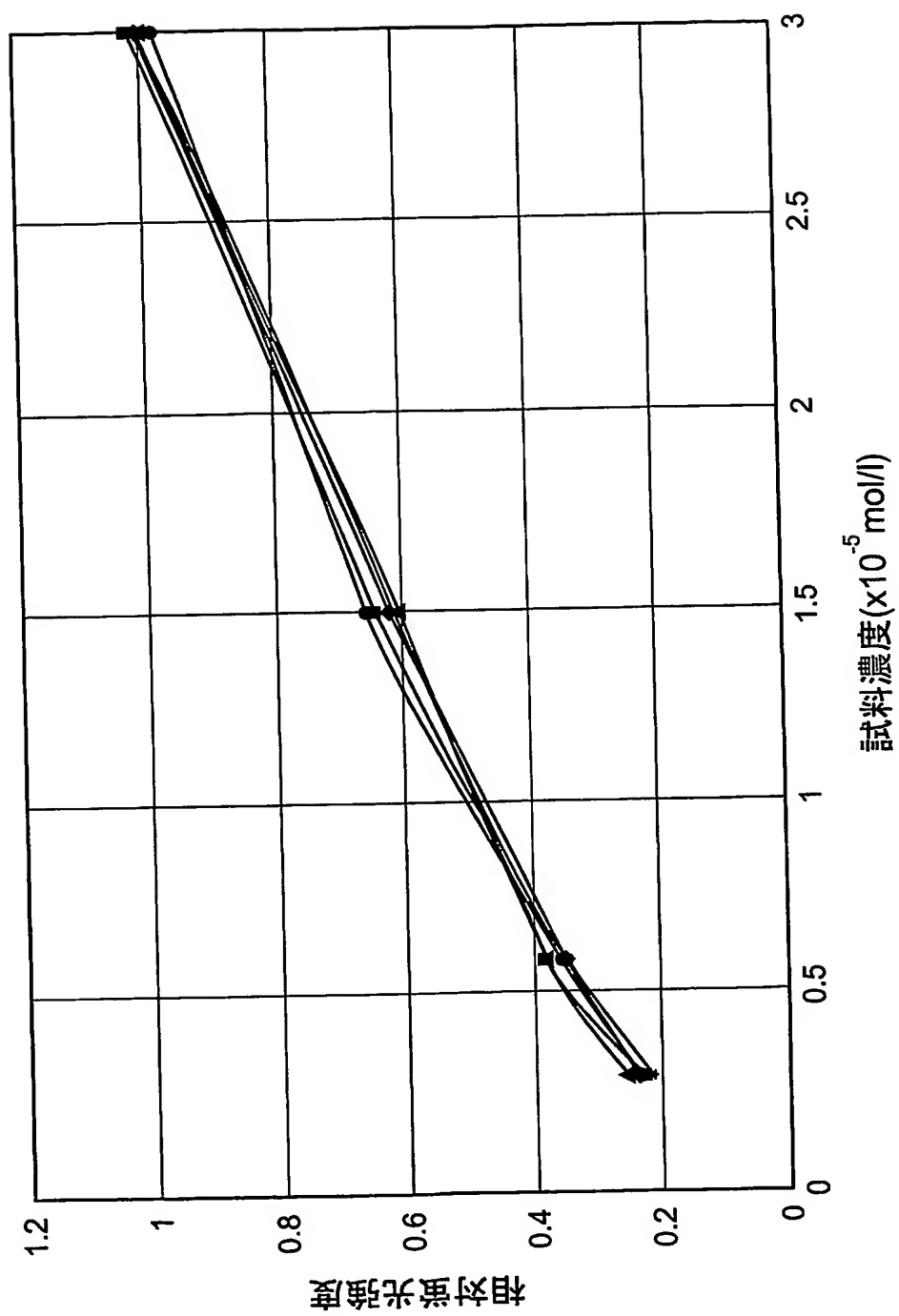
【図 6】



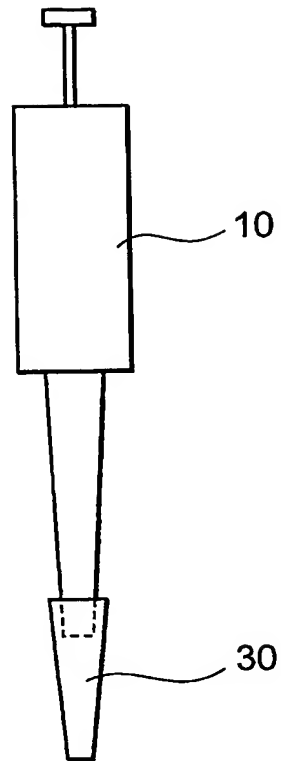
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 短時間で容易に微量の試料の蛍光を測定することができる蛍光測定装置を提供する。

【解決手段】 蛍光測定用ピペット 4 にチップ 30 が装着され、チップ 30 内に試料が計り取られて収容される。この状態を維持したまま、蛍光測定用ピペット 4 は蛍光測定装置 1 に装着される。励起光源 41 から出力された励起光は、レンズ 42 によりコリメートされ、アパーチャ 43 を通過し、ピペットアダプタ 20 の励起光導入窓 23 を透過し、ピペットアダプタ 20 の内部空間 20A に導入され、反射鏡 24 により反射されて、チップ 30 内に収容されている試料に対して液面上方から照射される。この励起光照射に因り試料で発生する蛍光のうち下方に放射されてレンズ 51 に入力したものは、レンズ 51 によりコリメートされ、光フィルタ 52 を透過して、光検出器 53 により受光される。

【選択図】 図 3

特願 2 0 0 3 - 3 8 5 0 0 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 2 3 6 4 3 6]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

静岡県浜松市市野町 1 1 2 6 番地の 1

氏 名

浜松ホトニクス株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.